

دور الخلايا الجذعية في اصلاح التغيرات المرضية الناجمة عن الانتان المحدث

تجريبياً في الجرذ

أحمد محمد علي السيدية * هناء خليل اسماعيل

جامعة الموصل ، كلية الطب البيطري ، فرع الامراض وامراض الدواجن، الموصل ، العراق.

Corresponding Author e.mail ;al2011saidya@gmail.com

الخلاصة

عزلت في هذه الدراسة الخلايا الجذعية اللحمية من نقي عظم الجرذ البيض مع امكانية تنميتها خارج الجسم الحي باستخدام الطريقة التقليدية التي تعتمد على قابلية الخلايا الجذعية اللحمية على الالتصاق بقاع دوارق الزرع النسجي واستخدم الوسط الزرع الخاص Dulbecco's Modified Eagle's medium والمزود بمصل الجنين البقري وفي ظروف زرعية تمثلت بدرجة حرارة ٣٧ م° ونسبة ٥% من غاز ثنائي اوكسيد الكربون.

خلال المراحل الاولى من زراعة نقي العظم أمكن تمييز نوعين من الخلايا. النوع الاول هي الخلايا الملتصقة في قاع دوارق الزرع النسجي والمتمثلة بالخلايا الجذعية اللحمية والنوع الثاني من الخلايا هي الخلايا الطافية والمتمثلة بالخلايا الجذعية المكونة للدم فضلاً عن باقي انواع خلايا نقي العظم المختلفة التي تم التخلص منها من خلال التغيير المستمر للوسط الزرع خلال مراحل تغذية وتنمية الخلايا الجذعية اللحمية .

أحدث الانتان تجريبياً في الجرذ من خلال استخدام نموذج جراحي يطلق عليه ربط الاعور وثقبه الذي يسبب حدوث الخمج متعدد الجراثيم واطهرت نتائج الدراسة حدوث انخفاض في معدلات البقاء على قيد الحياة للجرذ الى (٦٥%) بعد ٢٤ ساعة من احداث الانتان تجريبياً واستمر هذا الانخفاض في معدلات البقاء على قيد الحياة ليصل الى (٠%) بعد مرور ٧ ايام من احداث الانتان .. كما ولوحظ وجود تغيرات مرضية في بعض اعضاء وانسجة الجرذ وبشكل خاص في كل من نسيج الرئة والكبد تمثلت هذه التغيرات المرضية بحدوث احتقانات شديدة للاوعية الدموية واحتواء البعض منها على خثر دموية ، وجود التخر الشديد لخلايا هذه الانسجة مع ارتشاح الخلايا الالتهابية وخاصة العدلات و البلعميات فضلاً عن وجود مستعمرات جرثومية .

أظهرت نتائج حقن الخلايا الجذعية من خلال الوريد الذيلي للجرذ التي أحدث الانتان فيها تجريبياً من خلال ربط الاعور وثقبه ، حدوث تحسناً في معدلات البقاء على قيد الحياة حيث اظهرت نتائج الدراسة ارتفاع في معدلات البقاء على قيد الحياة للجرذ الى (٩٠%) بعد ٢٤ ساعة من احداث الانتان تجريبياً وحقن الخلايا الجذعية.

نسجياً لوحظ حدوث تحسن للأعضاء والانسجة المتضررة تمثلت بوجود نخر خلوي أقل شدة فضلاً عن انخفاض ارتشاح الخلايا الالتهابية ، مع ملاحظة تواجد الخلايا الجذعية اللحمية التي ظهرت بشكل مغزلي شبيه بالارومات الليفية وبشكل كثيف حول الاوعية الدموية ، وبشكل خاص في نسيج الكبد .

المقدمة

شهد العالم في السنوات الأخيرة اهتماماً بالغاً بتقنيات الخلايا الجذعية واستخداماتها التطبيقية ، وعلى الرغم من أن الدراسات والبحوث لاتزال في بدايات تطورها الا انها تشكل أملاً واعداً لعلاج العديد من الحالات المرضية سواءً في الانسان أم في الحيوان (١) وهناك أنواع عدة من هذه الخلايا التي يمكن تصنيفها بحسب مصادرها أو حسب قدرتها وفعاليتها على الانقسام الا أنه بشكل عام يوجد نوعان رئيسيان من الخلايا الجذعية Adult Stem cells و الخلايا الجذعية البالغة Embryonic Stem cells هما : الخلايا الجذعية الجنينية (٢ و ٣). تُعد الخلايا الجذعية اللحمية واحدة من اهم أنواع الخلايا الجذعية البالغة وتمتاز بكونها خلايا غير متخصصة تمتلك قدرات خاصة في الانقسام والتجدد لتكوين خلايا جذعية جديدة فضلاً عن قدرتها على التمايز والخلايا والعضلات والتخصص لأنواع مختلفة من خلايا الجسم مثل الخلايا العظمية والغضروفية وخلايا القلب العصبية وهذا ما زاد من اهميتها في الابحاث العلمية وتستخدم حالياً هذه الخلايا بما يعرف بالعلاج الخلوي Cell therapy (٤ و ٥)

يعرف الانتان Sepsis على انه متلازمة سريرية خطيرة تنتج من تفاعل معقد ما بين المضيف والمخجمات المرضية ، ويتميز باستجابة التهابية جهازية غير منتظمة وبصورة غير مسيطر عليها وتحدث نتيجة عدوى جرثومية وظهور الجراثيم وظيفاتها في الدم والأنسجة(6) .

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

الحيوانات المختبرية

تضمنت الدراسة استخدام الجرذ البيض Albino Rats البالغ بعمر (٥-٦) اسبوع وتراوحت اوزانها ما بين (٣٠٠-٣٥٠) غم والتي تم الحصول عليها من بيت الحيوانات التابع لكلية الطب البيطري جامعة الموصل واخضعت الحيوانات طوال مدة الدراسة لظروف مختبرية موحدة من درجة الحرارة والإضاءة والتهوية وربيت بأقفاص بلاستيكية خاصة مهيأة لهذا الغرض واعطيت الماء والعلف بشكل مستمر .

عزل الخلايا الجذعية اللحمية من نقي عظم الجرذ

استخدمت طريقتي (٧ و ٨) لعزل الخلايا الجذعية اللحمية من نقي عظام الفخذ والساق في الجرذ ، وأجري فحص يومي لدوارق الزرع النسجي لمتابعة نمو ونشاط الخلايا الجذعية مع إجراء تغيير للوسط الزرع كل (٢-٣) أيام وذلك بإزالة نصف الوسط الزرع القديم واستبداله بوسط زرع جديد وصُورت الخلايا الجذعية اللحمية باستخدام المجهر المقلوب Inverted Microscope وكاميرا رقمية .

احداث الانتان بطريقة ربط الاعور وثقبه Cecal ligation and puncture sepsis

تم إحداث الانتان المتعدد الجراثيم Poly-microbial sepsis باستخدام نموذج وضعه الباحثون (9) الذي يتضمن التدخل الجراحي لربط الاعور وثقبه لأحداث التهاب الخلب الغائطي Fecal peritonitis لحين أن يتطور إلى حالة الانتان.

تصميم التجربة :

المحور الأول : عزل الخلايا الجذعية اللحمية من نقي عظم الجرد

عزلت الخلايا الجذعية اللحمية من نقي عظام الفخذ والساق للجرذ ونُميت خارج الجسم الحي داخل دوارق الزرع النسيجي وباستخدام الوسط الزرع Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) من اجل تنمية وتكاثر هذه الخلايا الجذعية اللحمية لغرض استخدامها في المحور الثالث.

المحور الثاني : احداث الأذى في أعضاء وانسجة الجسم باستخدام الاثنان متعدد الجراثيم **polymicrobial Sepsis** والمحدث تجريبياً من خلال عملية ربط الاعور وثقبه **Cecal ligation and Puncture**

أستخدم في هذا المحور (٧٥) جرد وقسمت عشوائياً إلى ثلاث مجاميع متساوية العدد : المجموعة الاولى (٢٥) جرد : مجموعة السيطرة (السالبة) واعطيت الماء والعلف طول فترة الدراسة . المجموعة الثانية (٢٥) جرد : مجموعة السيطرة (الموجبة) تسمى sham- operated group ، التي فقط تم اخراج الاعور خارج التجويف البطني ثم ارجاعه مرة اخرى وخياطة منطقة الجراحة. المجموعة الثالثة (٢٥) جرد: مجموعة الاثنان المحدث جراحيًا من خلال عملية ربط الاعور وثقبه .

المحور الثالث : دراسة تأثير زرع الخلايا الجذعية اللحمية في الحد من او تقليل الآفات المرضية الناجم عن الإثنان حيث استخدم (80) جرد قسمت عشوائياً إلى اربعة مجاميع :

المجموعة الاولى : مجموعة السيطرة السالبة (20 جرد)

المجموعة الثانية : مجموعة السيطرة الموجبة (٢٠ جرد)

المجموعة الثالثة : تم معاملة الجرد هذه المجموعة جراحيًا لإحداث الاثنان (20 جرد) .

المجموعة الرابعة : تم استخدام (20 جرد) عوملت جراحيًا لإحداث الاثنان بالطريقة نفسها في جرد المجموعة الثانية وبعد ٣ ساعات تم حقن الجرد بالخلايا الجذعية اللحمية المعزولة من نقي العظم (2.5×10^5) وبجرعة (0.5 مل لكل حيوان) من خلال الحقن داخل الوريد الذيلي (١٠).

وقد اعتمدت المعايير الآتية لتقييم هذا المحور :

١- تحديد نسبة البقاء على قيد الحياة Survival rate .

٢- دراسة التغيرات المرضية العيانية والنسجية لكل من الكبد والرئة .

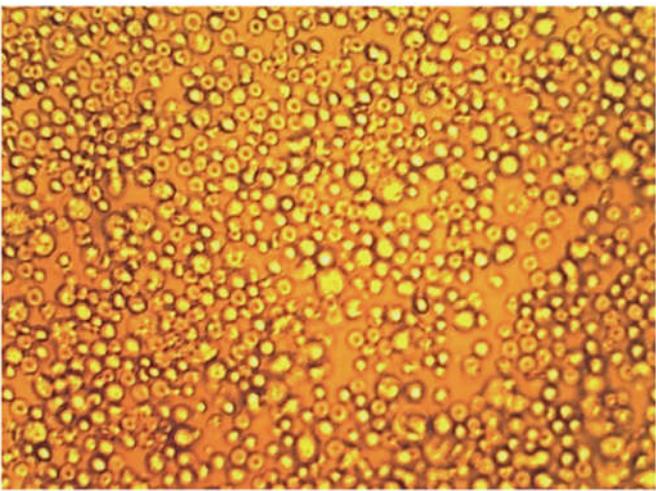
النتائج

المحور الاول : عزل الخلايا الجذعية اللحمية من نقي عظم الجرد

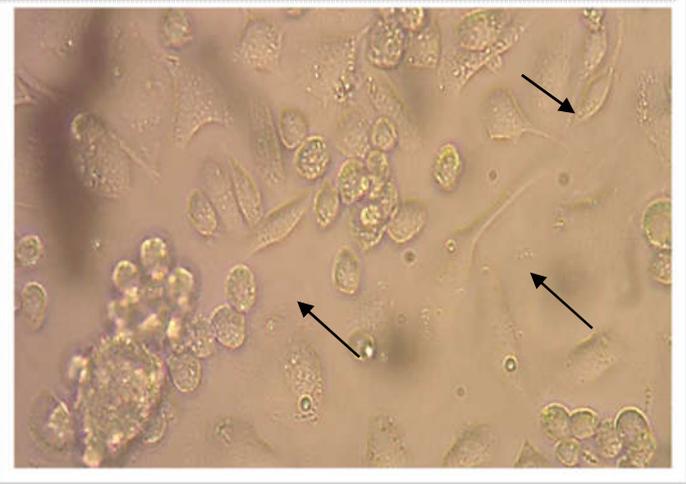
ظهرت خلايا نقي عظم الفخذ للجرذ بعد عزلها على شكل معلق خلوي طافي في دورق الزرع النسيجي باستخدام الوسط الزرع DMEM-high glucose والذي يعتبر الوسط الزرع الخاص بعزل الخلايا الجذعية اللحمية إذ احتوى هذا المعلق على كل من الخلايا الجذعية اللحمية التي عادةً ما تكون أعدادها قليلة جداً مقارنة بالخلايا الجذعية المكون للدم التي تواجدت أيضاً في المعلق الخلوي فضلاً عن باقي خلايا نقي العظم الاخرى (الشكل 1) .

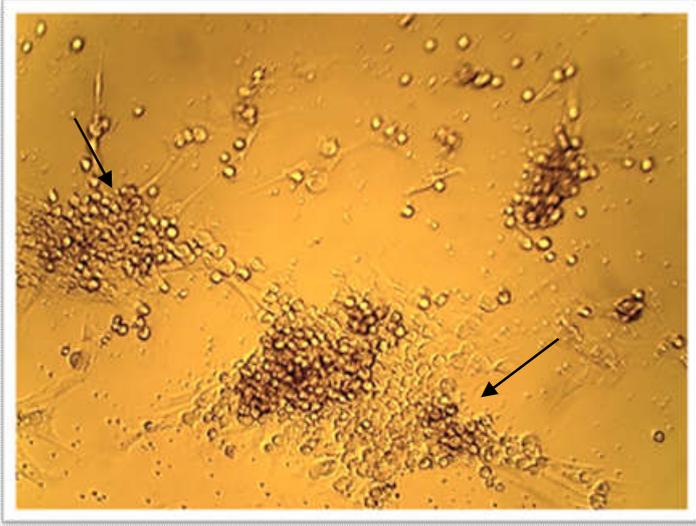
تم ملاحظة الخلايا باستخدام الفحص بالمجهر المقلوب إذ لوحظ وبعد مرور ٢٤ ساعة من الزرع الاولي استطالة مع استقرار لبعض من خلايا المعلق والتصاقها في قاع دورق الزرع النسجي بينما لوحظ أن باقي الخلايا كانت طافية في الوسط الزرعي وبعد مرور ٣ أيام من اجراء عملية الزرع الاولي لوحظ التصاق بعض الخلايا الجذعية اللحمية في قاع دورق الزرع النسجي التي اتصفت بشكلها المغزلي الشبيه بخلايا الارومة الليفية مع وجود بروزات بروتوبلازمية احادية اوثنائية القطب ممتدة من جسم الخلية الجذعية التي قد تمتد لتتصل مع خلايا جذعية اخرى قريبة (الشكل ٢) وخلال هذه المدة أمكن تمييز طبقتين خلويتين الاولى وهي طبقة الخلايا الجذعية اللحمية الملتصقة بقاع دورق الزرع النسجي أما الطبقة الثانية فهي عبارة عن طبقة من الخلايا الجذعية المكونة للدم الكروية وكذلك باقي خلايا نقي العظم والمعلقة في الوسط الزرعي التي لوحظ تناقصها وبشكل تدريجي مع كل تغيير للوسط الزرعي . بعد مرور ٧ ايام من عملية الزرع لوحظ تكوين مستعمرات خلوية التي هي عبارة عن تجمعات من الخلايا الجذعية اللحمية وهي تعتبر مؤشراً مظهرياً للتأكد من هوية الخلايا الجذعية اللحمية التي يطلق عليها وحدات المستعمرات المكونة للارومات الليفية CFU-F (الشكل ٣) إذ لوحظ على هذه المستعمرات التوسع والكبر تدريجياً من خلال الزيادة في عدد الخلايا والناجمة من زيادة فعاليتها وحيوتها كما ولوحظ هجرة أعداد من الخلايا الجذعية اللحمية إلى مناطق جديدة من دورق الزرع إذ تميزت بشكلها الكروي والصغيرة الحجم ثم بدأت بالالتصاق وتكوين خلايا جذعية شبيهة بالارومات الليفية ذات بروزات طويلة أو قصيرة تكون بعد مرور ١٤ يوم من الزرع طبقة أحادية محتشدة ومتجانسة من الخلايا الجذعية اللحمية بنسبة ٨٠- ٩٠% من الاحتشاد Monolayer (الشكل ٤).

شكل (1) : مزرعة خلايا نقي العظم في بداية الزرع توضح مختلف خلايا نقي العظم والتي تكون معلقة في الوسط الزرعي (400 x)



شكل (٢) : مزرعة خلايا نقي عظم الجرذ بعد مرور ٣ أيام من الزرع الاولي ، الذي يبين التصاق بعض خلايا الزرع النسجي والتي اتصفت بشكلها المغزلي (400X)





شكل (٣) : مزرعة خلايا نقي عظم الجرذ بعد مرور ٧ أيام من عملية الزرع الاولي و يلاحظ فيه تكوين مستعمرات والتي هي عبارة عن تجمعات من الخلايا الجذعية اللحمية والتي يطلق عليها وحدات المستعمرات المكونة للارومات الليفية CFU-F (100X).



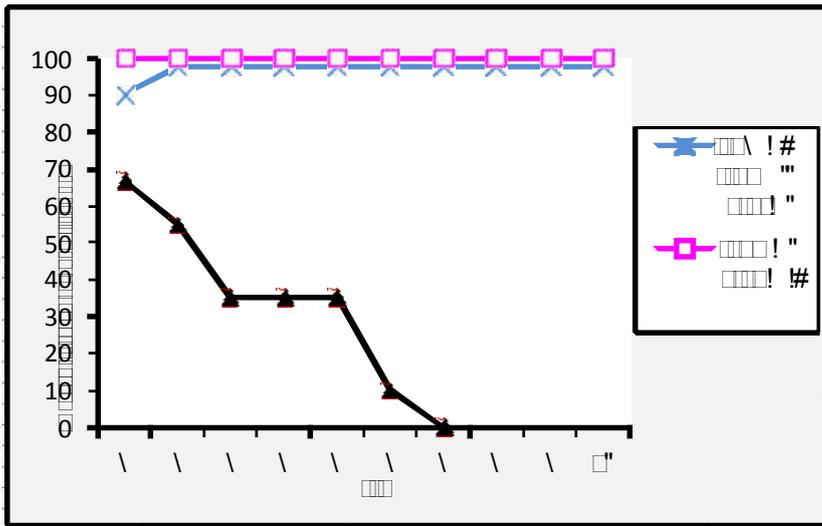
شكل (٤) : مزرعة خلايا نقي عظم الجرذ بعد مرور ١٤ يوم من الزرع الاولي الذي يوضح تكون طبقة محتشدة من الخلايا الجذعية (400x)

المحور الثاني :

إحداث الأذى في بعض أعضاء وأنسجة الجسم باستخدام الخمج متعدد الجراثيم **polymicrobial infection** والمحدث تجريبياً من خلال عملية ربط الاعور وثقبه **Cecal ligation and Puncture**.

معدل البقاء على قيد الحياة

أظهر معدل البقاء على قيد الحياة انخفاض في معدل البقاء على قيد الحياة للجرذ إلى (٦٥ %) بعد ٢٤ ساعة من عملية إحداث الإنتان بطريقة ربط الاعور وثقبه واستمر الانخفاض في معدل البقاء على قيد الحياة ليصل إلى (٠ %) بعد ٧ أيام من إحداث الإنتان . اما جرذ مجموعة السيطرة الموجبة (Sham-group) فقد لوحظ بعد ٢٤ ساعة من اجراء العملية الجراحية حدوث انخفاض في معدل البقاء على قيد الحياة إذ وصل إلى (٩٠ %) بعدها لم يحدث أي حالة نفوق في الجرذ طول مدة التجربة وكذلك في مجموعة السيطرة السالبة إذ لم يسجل أي حالة نفوق لجرذ هذه المجموعة الشكل (٥).



شكل رقم (٥) : معدل البقاء على قيد الحياة في كل من مجموعة السيطرة ومجموعة السيطرة الموجبة sham ومجموعة الانتان المحدث تجريبياً.

التغيرات المرضية النسجية **Histopathological changes**

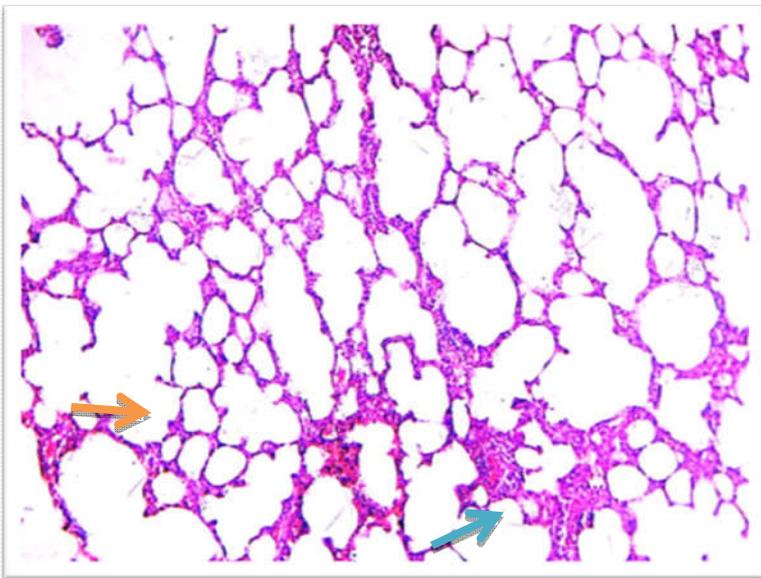
أوضح الفحص النسجي المجهرى في جرذ مجموعة السيطرة الموجبة Sham group التركيب السوي للرئة المتكون من الاسناخ الرئوية والقصيبات الرئوية ولم تظهر أي تغيرات مرضية عليها سوى ارتشاح طفيف للخلايا الالتهابية مع وجود نزف حول القصيبات الهوائية وبين الاسناخ الرئوية مع ملاحظة ظاهرة النفاخ Emphysema (الشكل ٦) اما في الكبد فقد أوضح الفحص النسجي المجهرى وجود تغيرات في الخلايا الكبدية تمثلت بالتتكس الفجوي والتغير الدهني بالإضافة الى نخر بعض الخلايا الكبدية وتوسع الاوردة المركزية والجيبانيات مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة. أما في جرذ مجموعة الإنتان المحدث تجريبياً (ربط الاعور وثقبه) ، فأظهر الفحص النسجي المجهرى بعد ٢٤ ساعة من إحداث الإنتان تجريبياً وجود احتقان

في الاوردة المركزية مع ملاحظة تفجعي Vacuolation وتورم الخلايا الكبدية الحاد Acute cellular swelling فضلاً عن النخر التجلطي للخلايا الكبدية في مركز الفصيص Centrilobular necrosis ووجود تكلف للخلايا الالتهابية اللمفية والعدلات حول الاوردة المركزية وازهرت وإرتشاح الخلايا الالتهابية وحيدة النواة في الباحة البابية مع توسع واحتقان الأوردة المركزية (الشكل ٧).

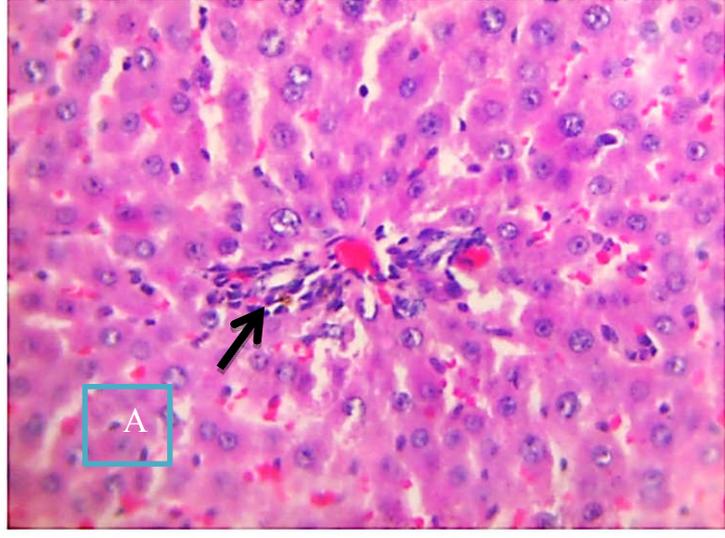
بعد ٣ أيام من إحداث حالة الإنتان لوحظ وجود تغيرات نسجية اكثر شدة تمثلت بالنخر التجلطي للخلايا الكبدية مع احتقان للأوردة المركزية فضلاً عن إرتشاح الخلايا الالتهابية في الباحة البابية ووجود ظاهرة الموت الخلوي المبرمج لبعض الخلايا الكبدية فضلاً عن النزف بين الخلايا الكبدية. وبعد ٧ أيام من إحداث الإنتان تجريبياً كانت الآفات المرضية النسجية اكثر شدة تمثلت بالنخر التجلطي للخلايا الكبدية حول الاوردة المركزية مع الخثرات حديثة التكوين Recent thrombus ملتصقة بجدار الوريد المركزي

وأوضح الفحص النسجي المجهرى لمقاطع الرئة في الجرذ المحدث بها الإنتان تجريبياً بعد ٢٤ ساعة وجود النزف بين الاسناخ الرئوية مع إرتشاح الخلايا الالتهابية حول الاوعية الدموية فضلاً عن الاحتقان الشديد للأوعية الدموية بين الاسناخ الرئوية مع وضوح ظاهرة النفاخ الرئوي . أما بعد ٣ أيام من إحداث الإنتان فلو حظ وجود حالة ذات الرئة الخلاي Interstitial pneumonia التي تميزت بإرتشاح كثيف للخلايا الالتهابية المتمثلة بالخلايا اللمفية والعدلات بين الاسناخ الرئوية التي سببت تثخن شديد في جدران الاسناخ الرئوية كما لوحظ في مقاطع نسجية اخرى نخر وتوسف الخلايا الظهارية المبطنة للقصيبات الهوائية مع تثخن لجدران بعض الاوعية الدموية (الشكل ٨).

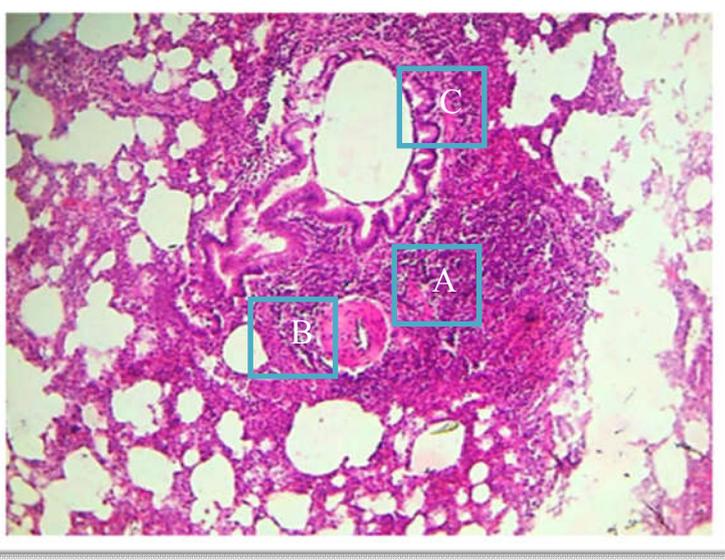
بعد ٧ أيام من إحداث حالة الإنتان لوحظ وجود آفات مرضية متقدمة واكثر شدة تمثلت بالتهاب الرئة والقصيبات Bronchopneumonia حيث لوحظ تحطم شديد للأسناخ الرئوية مع ارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية اللمفية و البلعمات الكبيرة في النسيج الخلاي وحول القصيبات الرئوية التي كانت تعاني من فرط تنسج الخلايا الظهارية المبطنة لها فضلاً عن توسف في الخلايا الظهارية المبطنة للقصيبات الهوائية وتثخن جدران الاوعية الدموية ووجود خثرة دموية حديثة التكوين داخل الاوعية الدموية (الشكل ٩) .



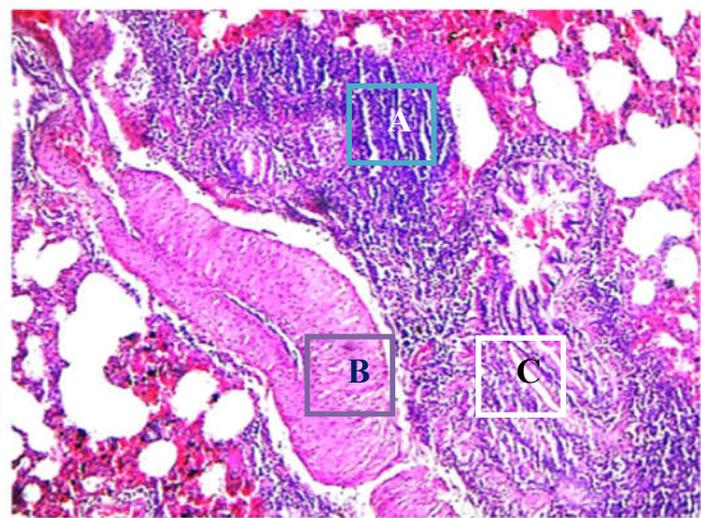
شكل (٦) : مقطع نسجي لرئة جرذ من مجموعة السيطرة sham بعد ٣ أيام ، ارتشاح طفيف للخلايا الالتهابية فضلاً عن النفاخ (←) .
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 60 x



شكل (٧) : مقطع نسجي لكبد جرد بعد ٢٤ ساعة من احداث الانتان ، يوضح احتقان الوريد المركزي مع ارتشاح الخلايا الالتهابية حوله (السهم) بالإضافة الى النخر التجلطي للخلايا الكبدية (A).
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 105 x



شكل (٨) : مقطع نسجي لرئة جرد بعد ٣ أيام من احداث الانتان ، يوضح تتخن جدار الاسناخ الرئوية بسبب الارتشاح الكثيف للخلايا الالتهابية (A) مع التتخن الشديد لجدار الوعاء الدموي (B) فضلاً عن فرط تنسج لظهارة القصيبات الهوائية (C).
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 60 x



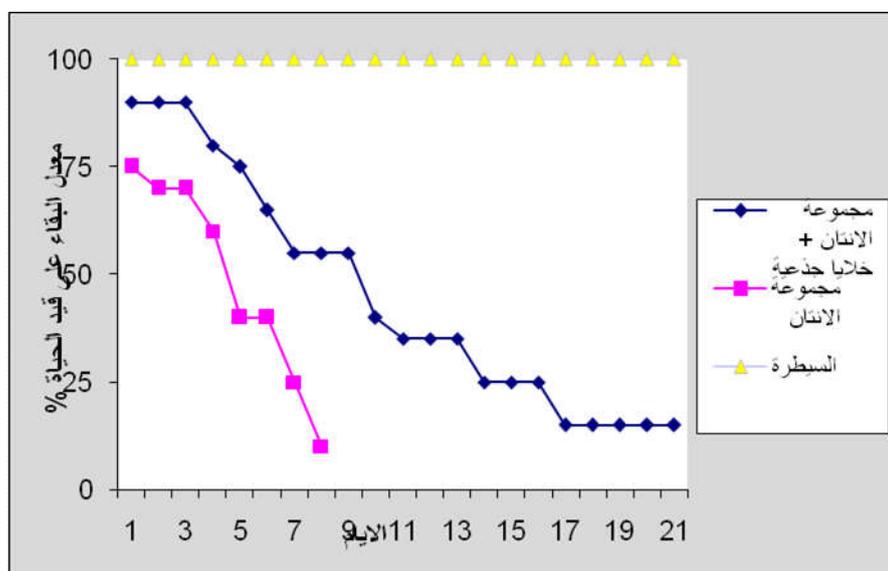
شكل (٩) : مقطع نسجي لرئة جرد بعد ٧ أيام من احداث الانتان ، يوضح التهاب الرئة والقصيبات متمثلاً بوجود ارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية حول القصيبات الهوائية وحول الاوعية الدموية (A) مع وجود تتخن شديد لجدار الوعاء الدموي (B) فضلاً عن النخر والتوسف للخلايا الظهارية المبطنة للقصيبات الهوائية (C).
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 105 x

المحور الثالث :

دراسة تأثير حقن الخلايا الجذعية اللحمية في الحد من أو تقليل الآفات المرضية الناجمة عن الإنتان

Survival Rate معدل البقاء على قيد الحياة

أظهرت نسب معدلات البقاء على قيد الحياة في جرد التجربة التي حُقنت بالخلايا الجذعية بعد إحداث الإنتان فيها بقائها إلى اليوم ٢١ بعد إحداث حالة الإنتان وكانت نسبة البقاء على قيد الحياة خلال ٢٤ ساعة من الإنتان ٩٠% واستمرت هذه النسبة بدون انخفاض وعدم حدوث نفوق إلى اليوم الثالث . في حين كانت نسبة البقاء على قيد الحياة في جرد مجموعة الإنتان ٧٥% بعد ٢٤ ساعة من إحداث الإنتان فيها واستمرت بالانخفاض إلى اليوم الثامن من التجربة لتصل إلى ٠% . ولم تسجل أي حالة نفوق في مجموعة السيطرة خلال مدة التجربة الشكل (١٠).



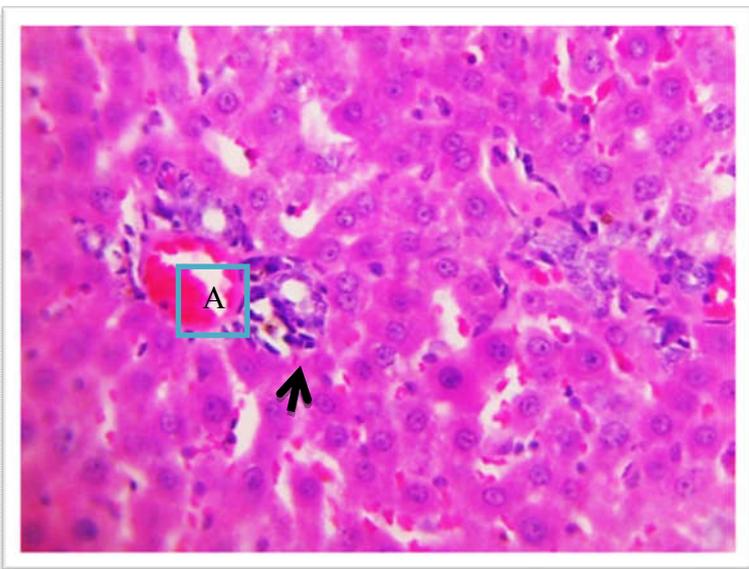
شكل رقم (١٠) : معدل البقاء على قيد الحياة في كل من مجموعة السيطرة ومجموعة

الإنتان المحدث تجريبياً ، ومجموعة الإنتان المحقونة بالخلايا الجذعية

التغيرات المرضية النسيجية Histopathological changes

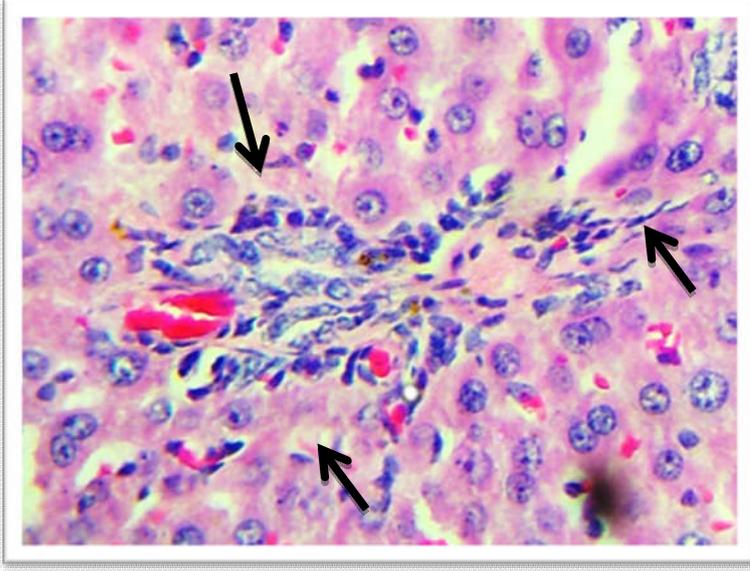
أوضح الفحص المجهرى النسيجي بعد ٢٤ ساعة من المعاملة وجود تغيرات خلوية ووعائية تمثلت بنزف في متن الكبد واحتقان شديد للأوردة المركزية والاعوية الدموية في الباحة البابية مع إرتشاح كثيف للخلايا الالتهابية وخاصة الخلايا اللمفية والعدلات والخلايا البلعمية حول الأوردة المركزية وفي الباحة البابية ، فضلاً عن النخر التجلطي للخلايا الكبدية وخاصة الخلايا الكبدية حول الأوردة المركزية كذلك لوحظ ظهور بعض الخلايا الكبدية التي تعاني من الموت الخلوي المبرمج وملاحظة إرتشاح بعض الخلايا الجذعية التي ظهرت بشكل مغزلي شبيه بالارومات الليفية Fibroblast وخاصة حول الاعوية الدموية في الباحة البابية والأوردة المركزية (شكل ١١) أما بعد ٣ أيام من المعاملة فقد أظهرت المقاطع النسيجية تغيرات تمثلت بالاحتقان الشديد للأوردة المركزية إضافة

إلى توسع في الجيبانيات والنخر التجلطي للخلايا الكبدية وارتشاح بعض الخلايا الجذعية شبيه بالارومات الليفية حول الاوردة المركزية وفي الباحة البابية وفي الجيبانيات مع إرتشاح اعداد قليلة من الخلايا الالتهابية اللمفية والبلعمية حول الاوردة المركزية (شكل ١٢). وبعد ٧ أيام لوحظ احتقان وتوسع في الأوردة المركزية مع وجود الخثرة الدموية وارتشاح الخلايا الجذعية الشبيهة بالارومات الليفية والتي ظهرت بشكل تجمعات دائرية بالقرب من الباحة البابية وارتشاح الخلايا الالتهابية في متن الكبد. وبعد ١٤ و ٢١ يوماً كانت الآفات المرضية مشابهة للآفات السابقة ولكن بصورة اشد إذ لوحظ توسع في الاوردة المركزية بسبب النخر الشديد للخلايا الكبدية حول الوريد المركزي مع ملاحظة نخر الخلايا الكبدية (شكل ١٣). أوضح الفحص النسجي المجهرى للرئة بعد ٢٤ ساعة من إحداث الإنتان وحقن الخلايا الجذعية وجود تغيرات نسجية تمثلت بإرتشاح الخلايا الالتهابية بين الاسناخ الرئوية وخاصة الخلايا اللمفية والعدلات مع احتقان شديد في الاوعية الدموية بين الاسناخ الرئوية فضلاً عن وجود النفاخ في الاسناخ الرئوية Pulmonary Emphysema ووضوح النزف بين الاسناخ الرئوية (شكل ١٤). بعد ٣ أيام من الحقن بالخلايا الجذعية ظهرت تغيرات مرضية نسجية تمثلت بوضوح ظاهرة النفاخ الرئوي مع وجود الوذمة edema في الاسناخ الرئوية. أما بعد ٧ أيام من الحقن بالخلايا الجذعية فقد لوحظ تثخن شديد في جدران الاسناخ الرئوية نتيجة لإرتشاح الخلايا الالتهابية وخاصة اللمفية مع تكثف الخلايا اللمفية حول القصيبات الهوائية وبين الاسناخ الرئوية كما ولوحظ فرط تنسج الخلايا الظهارية المبطن للقصيبات الهوائية. اما بعد ١٤ و ٢١ يوماً فقد لوحظ وجود احتقان شديد في الأوعية الدموية مع تثخن في جدرانها مع تنخر شديد وتوسع الخلايا الظهارية المبطن للقصيبات الهوائية فضلاً عن وضوح ظاهرة النفاخ في نسيج الرئة (شكل ١٥). أظهرت المقاطع النسجية لجرذان مجموعة الإنتان المحدث تجريبياً والمحقونة بالخلايا الجذعية اللحمية والمصبوغة بملون كرام المحورة للنسيج (براون وبرين) تواجد أعداداً قليلة من مستعمرات الجراثيم فضلاً عن تلون الخلايا الالتهابية والجذعية باللون الاحمر في حين أن باقي خلايا النسيج قد تلونت باللون الاصفر كما لوحظ تواجد مستعمرات قليلة للجراثيم في نسيج الرئة والتي تلونت باللون الاسود في حين ظهرت الخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية الشبيهة بالارومات الليفية بلون احمر (الشكل ١٦).

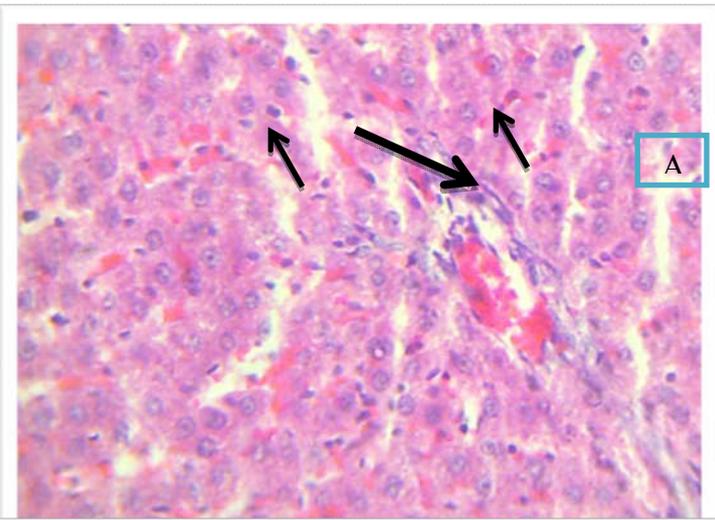


شكل (١١) مقطع نسجي لكبد جرذ بعد مرور ٢٤ ساعة من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية الذي يوضح احتقان الوريد المركزي (A) مع ملاحظة ارتشاح الخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية الشبيهة بالارومات الليفية حول الوريد المركزي وفي الباحة البابية(السهم).

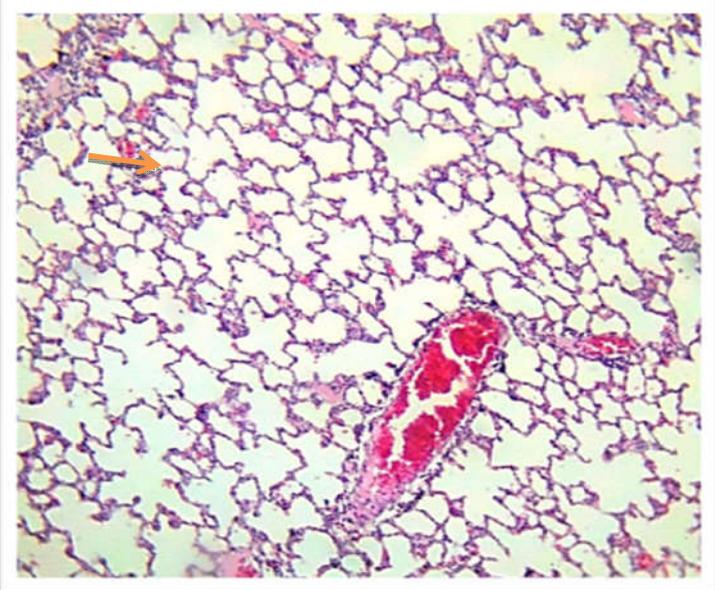
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين x 420



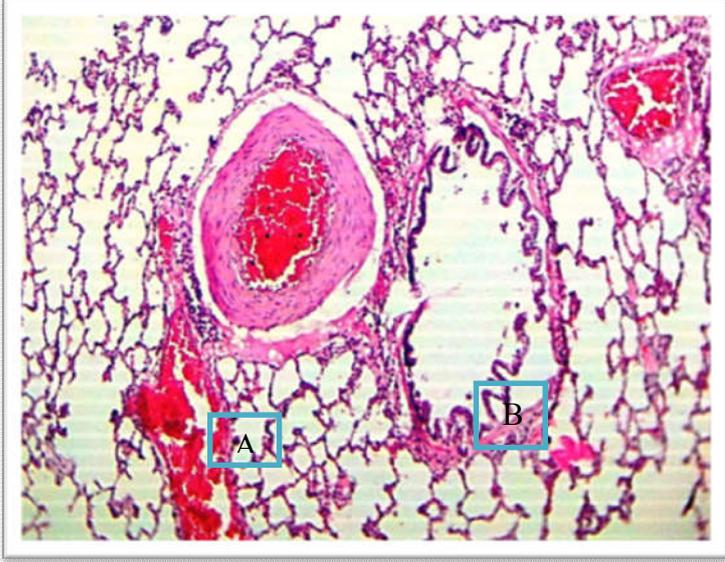
شكل (١٢) مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور ٣ ايام
من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية
يوضح ارتشاح الخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية
الشبيهه بالارومات الليفية في الباحة البابية (السهم) .
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 1440 x



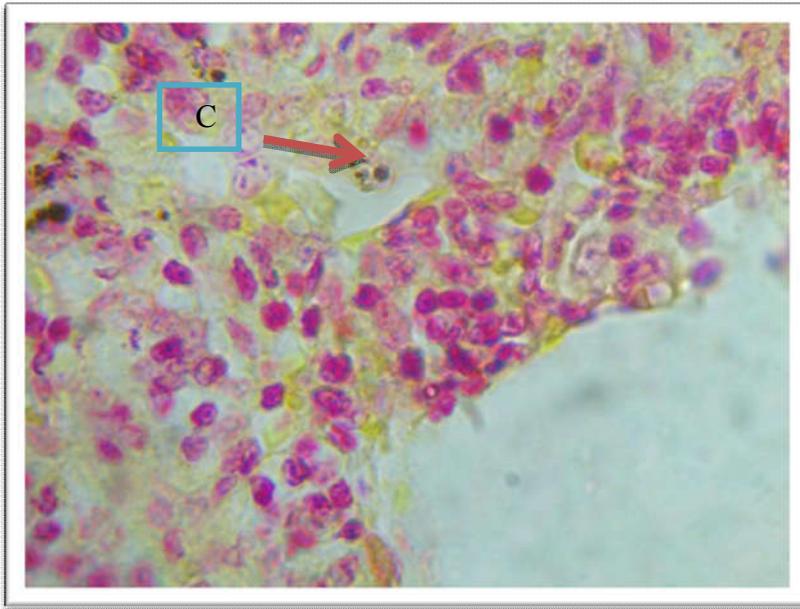
شكل (13) مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور ١٤ يوم
من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية
يوضح ارتشاح الخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية
الشبيهه بالارومات الليفية في الباحة البابية (السهم)
مع النخر الشديد للخلايا الكبدية (A) .
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 350 x



شكل (14) مقطع نسجي لرئة جرد بعد مرور ٢٤ ساعة
من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ،
يوضح احتقان الاوعية الدموية مع تكفف الخلايا
الجذعية حولها (←) فضلاً عن النفاخ (←) .
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 60 x



شكل (15) مقطع نسجي لرئة جرد بعد مرور ١٤ يوم من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية يوضح التثخن الشديد لجدار الاوعية الدموية واحتقانها (A) وتنخر وتوسف لظاهرة القصيبات الهوائية (B) ووضوح النفاخ في الاسناخ الرئوية (C) ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 60 x



شكل (١٦) مقطع نسجي لرئة جرد بعد مرور ٣ أيام من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح تواجد أعداد قليلة من مستعمرات الجراثيم (السهام) ، فضلاً عن تلون الخلايا الالتهابية والجذعية باللون الاحمر في حين أن باقي النسيج تلون باللون الاصفر. ملون الكرام المحورة للنسيج 1440 x

المناقشة

اجريت هذه الدراسة لغرض عزل الخلايا الجذعية البالغة من نقي عظم الجرد وبشكل خاص الخلايا الجذعية اللحمية وانماؤها وتكثيرها خارج الجسم الحي وذلك من خلال زرعها في دوارق الزرع النسجي وباستخدام واستغلال الامكانات البسيطة المتاحة وذلك لغرض استخدامها في تقليل الافات والاذى الناجم عن

الانتان المحدث تجريبياً في الجرذ بطريقة جراحية من خلال ربط الاعور وثقبه حيث أن أي محاولة لاستخدام الخلايا الجذعية في العلاج الخلوي يتطلب أولاً عزل هذه الخلايا ومن ثم تنميتها في مزارع خلوية بهدف الحصول على كميات وافرة منها تكفي للعلاج . عُزلت في هذه الدراسة الخلايا الجذعية للحمية من الانسجة البالغة المتمثلة بنقي العظام وبالأخص عظمتي الفخذ والساق وتنميتها خارج الجسم الحي ويعد نقي العظم واحداً من المصادر الغنية بالخلايا الجذعية وبشكل خاص الخلايا الجذعية المكونة للدم والخلايا الجذعية للحمية واتفقت هذه النتائج مع كل من (11،7) في حين أشارت دراسات اخرى إلى امكانية عزل الخلايا الجذعية من انسجة واعضاء الجسم الاخرى مثل المشيمة ودم الحبل السري والسائل الامنيوتي وكذلك من الانسجة الدهنية (8 ، 12 ، 13) . عُزلت خلال هذه الدراسة الخلايا الجذعية للحمية باستخدام الطريقة التقليدية المتمثلة بزراع نقي العظم بشكل كامل في دوارق الزرع النسجي وباستخدام الوسط الزرع DMEM واستخدمت هذه الطريقة من قبل (14 و 15) وتلخصت هذه الطريقة التقليدية بحقن الوسط الزرع في تجويف العظم حيث تدفع خلايا نقي العظم بشكل كامل إلى دوارق الزرع النسجي وكررت هذه العملية مرات عدة حتى فرغت قصبه العظم من النقي وتعد الطريقة التقليدية لعزل الخلايا الجذعية للحمية من الطرق السهلة التي تعتمد بشكل اساسي على قابلية الخلايا الجذعية للحمية على الالتصاق بقعر دوارق الزرع النسجي خلال الساعات الاولى من عملية الزرع الاولى (16) وتتميز هذه الطريقة بكونها تقلل من عملية التلوث التي تحدث للمزارع النسجية خلال عملية الزرع التي تعد من اهم المعوقات التي تصاحب عملية عزل الخلايا الجذعية فضلاً عن أن استخدام هذه الطريقة تساعد الباحثين في الحصول على أكبر عدد ممكن من الخلايا الجذعية للحمية التي تتميز بقلة أعدادها في الانسجة البالغة . كما تتميز الطريقة التقليدية أيضاً بتوفير طيف واسع من تجمعات الخلايا الموجودة في نقي العظم داخل دوارق الزرع النسجي التي تعد كطبقة مغذية تساعد في نمو هذه الخلايا الجذعية للحمية من خلال العديد من عوامل النمو مما يهيئ ظروف زرع مناسبة لنمو وتكاثر الخلايا الجذعية .

يتسبب الانتان بإحداث استجابة التهابية جهازية والتي تحدث بسبب الخمج بالمسببات المرضية وخاصة الجرثومية الذي بدوره يسبب تحرير مستويات عالية من الوسيطات والسايوتوكينات البادئة للالتهاب مما يسبب حدوث النفوق والأذى الكبير للانسجة والاعضاء المختلفة (17).

تلعب الخلايا الجذعية للحمية دوراً مهماً في العمليات الترميمية والعلاجية وذلك من خلال العديد من الآليات منها عملية اندماج Infusion لهذه الخلايا الجذعية للحمية مع خلايا النسيج المتضررة إذ تقوم الخلايا الجذعية بنقل المكونات الخلوية الحيوية إلى الخلية المتضررة (18). كذلك تقوم الخلايا الجذعية للحمية بوظائف افرازية للعديد من السايوتوكينات وعوامل النمو المختلفة التي تقوم بتقليل حالات الالتهاب والموت المبرمج للخلايا فضلاً عن تحفيزها لعملية تكوين اوعية دموية جديدة Angiogenesis (10 ، 19) .

أظهرت نتائج زرع الخلايا الجذعية للحمية من خلال الوريد الذيلي Tail vein للجرذ المحدث بها الانتان من خلال نموذج CLP تحسناً في معدلات البقاء على قيد الحياة مقارنة مع جرذ مجموعة الانتان لوحده وجاءت هذه النتائج متفقة مع العديد من الدراسات والبحوث التي استخدمت الخلايا الجذعية للحمية مع حالات الانتان المحدث تجريبياً (20) فيما سجلت نتائج الباحث (21) تحسناً معنوياً في معدلات البقاء على قيد الحياة من 1-50% بعد مرور 4 أيام من إحداث الانتان تجريبياً في الفئران باستخدام نموذج CLP من خلال حقن الخلايا

الجدعية اللحمية عن طريق الوريد كما سجلت ايضاً نتائج (22) تحسناً كبيراً في معدلات البقاء على قيد الحياة من 20-80% بعد اليوم العاشر وباستخدام نموذج الانتان نفسه .

أوضحت نتائج الفحص المجهرى لأنسجة الجرد التي احدث فيها الانتان تجريبياً والمحقونة بالخلايا الجذعية اللحمية وجود تحسناً في الاعضاء والانسجة المتضررة واتفقت هذه النتائج مع كل من (5، 23، 24) وسجل الباحث (25) تواجد كثيف للخلايا الجذعية اللحمية في كل من الرئة والكبد بعد إحداث الانتان تجريبياً من خلال حقن متعدد الببتيدات السكرية LPS- induced sepsis. في حين اوضحت نتائج الباحث (21) أن التركيز العالي للخلايا الجذعية اللحمية كان في كل من الرئة والكلية والطحال كاستجابة للانتان المحدث من خلال CLP .

ان الخلايا الجذعية اللحمية تقوم بتحرير البروستاغلاندين PGE2 الذي يعد واحداً من العوامل الحيوية في تقليل الالتهاب ويسبب تحرير PGE2 وزيادة في تحفيز الخلايا البلعمية المتواجدة في الانسجة المتضررة على تحرير IL-10 خلال الانتان وأن عملية تنظيم تحرير هذا الساييتوكين من قبل الخلايا البلعمية يكون مسؤول عن زيادة في معدلات البقاء على قيد الحياة وكذلك في تحسين وظائف الاعضاء الحيوية (21، 26). كما تقوم الخلايا الجذعية اللحمية بإفراز بروتينات مهمة مثل Stimulated Gene / protein 6 الذي يتفاعل مع مستقبلات CD44 الموجودة على الخلايا البلعمية المتواجدة داخل الانسجة المتضررة مما يسبب تنظيم تثبيطي Down-regulation لعامل النواة (NF-kB) Nuclear Factor مما يسبب تثبيط افراز عامل نخر الورم TNF- α من هذه الخلايا البلعمية (22، 27).

THE ROLE OF STEM CELLS IN THE REPAIR OF THE PATHOLOGICAL CHANGES OF SEPSIS EXPERIMENTALLY INDUCED IN RATS

Ahmed M.A. Alsaidya Hanaa kh. Ismail

Department of pathology and Poultry Diseases, College of Veterinary Medicine ,
University of Mosul , Mosul , Iraq.

ABSTRACT

In this study , Isolation of mesenchymal stem cells (MSCs) has been achieved from rats bone marrow , with possibility of enhanced their proliferation *in vitro* by using the classical method , which depends on the adhering capability of MSCs in tissue culture flasks , and using

Dulbecco 's Modification Eagle's Media" DMEM" supplemented with fetal bovine serum and in culture conditions at 37C° with 5% CO₂ .

During the early stages of initial culture , two types of cells populations had been distinguished. The first type is the cells adherent to the bottom of tissue culture flasks (MSCs), The second type of cell is the floating cells of hematopoietic stem cells as well as the other types of bone marrow cells, that are eliminated through the continues changing of the culture media for feeding and development of stem cells (MSCs).

The poly microbial Sepsis , has been induced in rats experimentally by using a surgical model called Cecal Ligation and Puncture (CLP) . The results of this study showed a decrease in the survival rate in rats to (65%) after 24h. of sepsis induction. The decreasing in survival rates was continues to reach (0%) after 7 days of sepsis induction.

Pathological lesions were seen in the lung and liver, that include severe congestion of blood vessels , with containing some thrombus, severe necrosis with severe infiltration of inflammatory cells (specially neutrophils and macrophages), and the present of bacterial colonies .

The results of intravenous (I/v) injection of MSCs to septic rats , showed improvement in the survival rates up to (90%) after 24h. of sepsis induction, Histopathological examination showed improvement in the injured tissues through decrease the rate of necrosis and infiltration of the inflammatory cells , with marked infiltration of fibroblast like MSCs around the blood vessels and in the parenchyma , tissue of the liver .

المصادر

- 1- Gade N.E. , Pratheesh M.D. , Nath A. , Dubey P.K. , Amarpal G. and Sharma T. (2012). Therapeutic potential of stem cells in veterinary practice. Vet. World. 5(8): 499-507.
- 2- Gattegno-Ho D. , Argyle S.A. and Argyle D.J.(2012). Stem cells and veterinary medicine: Tools to understand diseases and enable tissue regeneration and drug discovery. Vet. J. 191(1):19-27.
- 3- Larijani B. , Esfahani E.N. , Amini P. , Nikbin B. , Alimoghaddam K. , Amiri S. , Malekzadeh R. , Yazdi N.M. , Ghodsi M. , Dowlati Y. , Sahraian M.A. and Ghavamzadeh A.(2012). Stem cell therapy in treatment of different diseases. Acta. Med. Iran.
- 4- Ankrum J. and Karp J.M. (2010). Mesenchymal stem cell therapy:Two steps forward, one step back. Trends Mol. Med. 16(5):203- 209.
- 5- Elman J.S. , Li, M. , Wang F. , Gimble J.M. and Parekkadan B. (2014). A comparison of adipose and bone marrow-derived mesenchymal stromal cell secreted factors in the treatment of systemic inflammation. J. Inflamm. 11(1): 1-8.
- 6- Lima J.D. , Skare T.L. , Malafaia O. , Ribas-Filho J.M. , Michaelis T. , Ribas F.M. and Macedo R.C. (2011). Sepsis model to induce syndrome of multiple organ dysfunction : an experimental study in rats. Arq. Bras. Cir. Dig. 24(2): 95-102

٧- السبعراوي، رشا عزيز محمد (٢٠١٣). عزل وتنمية الخلايا الجذعية اللحمية من مصادر مختلفة من الفئران المهقاة ومحاولة لعلاج داء السكر المستحدث. اطروحة دكتوراه ، جامعة الموصل ، كلية العلوم .

- 8- Nadri S. , Soleimani M. , H|osseni R. , Massumi M. , Atashi A. and Izadpanah R. (2007). An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 51(8):723-729.
- 9- Wichterman K.A. , Baue A.E. and Chaudry I.H.(1980). Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J. Surg. Res.* 29(2):189-201.
- 10- Wannemuehler T.j. , Manukyan M.C. , Brewster B.D. , Rouch J. , Poynter J.A. and Meldrum D.R.(2012). Advances in Mesenchymal Stem Cell Research in Sepsis. *J. Sur. Res.* , 173(1): 113–126.
- 11- Smajilagic A.k , Aljičević M. , Redžić A. and Lagumdžija A.C. (2013). Rat bone marrow stem cells isolation and culture as a bone formative experimental system. *Bosn J Basic Med Sci.* , 13(1): 27-30.
- 12- Minter D. , Marra K.G. and Rubin J.P.(2013). Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* ,129:59-71.
- 13- Trivanović D. , Kocić J. , Mojsilović S. , Krstić A. , Ilić V. , Djordjević I.O. , Santibanez J.F. , Jovčić G. , Terzić M. and Bugarski D. (2013). Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. *Srp. Arh. Celok. Lek.* , 141(3-4):178-86.
- 14- Jia G.Q , Zhang M.M. , Yang P. , Cheng J.Q . , Lu Y.R. , Wu X.T. , Sichuan B. and Yi X.B. (2009). Effects of the different culture and isolation methods on the growth, proliferation and biology characteristics of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Sichuan University. Medical Science* , 40(4):719-723.
- 15- Zhao L. , Feng Z.H. , Jiao S.X. and Li, N. (2011). Culture condition and biological characteristics of rat bone marrow mesenchymal stem cells by

using the whole bone marrow adherence method. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research* , 15(32): 5923-5927.

- 16- Friedenstein A.J. , Chailakhyan R.K. , Latsinik N.V. , Panasyuk A.F. and Keiliss-Borok I.V. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, 17(4):331–40.
- 17- Dejager L. , Pinheiro I. , Dejonckheere E. and Libert C. (2011). Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis. *Trends Micro.* , 19(4): 198-208.
- 18- Mok P.L. , Leong C. F. and Cheong S. K. (2013). Cellular mechanisms of emerging applications of mesenchymal stem cells. *Malaysian J. Pathol.* , 35(1) : 17 – 32.
- 19- Kinnaird T. , Stabile E. , Burnett M.S. , Fuchs S. and Epstein S.E. (2004). Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ. Res.* , 94(5):678-685.
- 20- Gupta N. , Su X. , Popov B. , Lee J.W. and Matthay M.A. (2007). Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J. Immunol.* , 179(3):1855-1863.
- 21- Nemeth K. , Leelahavanichkul A. , Yuen P.S. , Mayer B. Parmelle A. and Doi K. (2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E₂-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat. Med.* , 15(1):42-9.

- 22- Gonzalez-Rey E. , Anderson P. and Gonzalez M.A. (2009). Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut.* , 58:929.
- 23- Ortiz L.A. , Dutreil M. and Fattman C. (2007). Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 104(26):11002-11007.
- 24- Hall S.R. , Tsoyi K. , Ith B. , Padera R.F. , Jr Lederer J.A. , Wang Z. , Liu X. and Perrella M.A.(2013). Mesenchymal stromal cells improve survival during sepsis in the absence of heme oxygenase-1: the importance of neutrophils. *Stem Cells.* 31(2):397-407.
- 25- Weil B.R. , Markel T.A. , Herrmann J.L. , Abarbanell A.M. , Kelly M.L. , Meldrum D.R.(2009). Stem cells in sepsis. *Ann. Surg.* , 250(1):19-27.
- 26- Spaggiari G.M. , Capobianco A. , Becchetti S. , Mingari M.C. and Moretta L.(2006). Mesenchymal stem cell natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK cell proliferation. *Blood* ,107(4):1484-1490.
- 27- Iyer S.S. and Rojas M.(2008). Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. *Expert Opin. Biol. Ther.* , 8(5):569-81.

